

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/12, C12N 7/02		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/04803
			(43) Date de publication internationale: 13 février 1997 (13.02.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01195 (22) Date de dépôt international: 29 juillet 1996 (29.07.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/09374 1er août 1995 (01.08.95) FR 96/03638 22 mars 1996 (22.03.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69348 Lyon Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FANGET, Bernard [FR/FR]; La Vavre, F-69210 Saint-Germain-sur-l'Arbresle (FR). FRANÇON, Alain [FR/FR]; La Grand Croix, Brul- lioles, F-69069 Bessenay (FR). HEIMENDINGER, Pierre [FR/FR]; Le Montségur, 35, rue Bataille, F-69008 Lyon (FR). (74) Mandataire: BERNASCONI, Jean; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: METHOD FOR INDUSTRIALLY PRODUCING A JAPANESE ENCEPHALITIS VACCINE, AND RESULTING VACCINE			
(54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION INDUSTRIELLE D'UN VACCIN CONTRE L'ENCEPHALITE JAPONAISE ET VACCIN OBTENU			
(57) Abstract			
<p>A method is disclosed for industrially producing a Japanese encephalitis vaccine, wherein (a) cells from a cell line are cultured, (b) the resulting cell culture is inoculated with a Japanese encephalitis virus in the presence of a viral growth medium, (c) the virus is propagated and multiplied on the cells, (d) the viral growth medium is recovered in the form of a suspension of viruses produced by the cells, (e) the virus suspension is purified in at least one ion exchange chromatography step and a gel permeation step, and (f) the virus suspension is formulated and converted into a pharmaceutical form to preserve it until the moment of use. A Japanese encephalitis vaccine characterised in that it comprises a Japanese encephalitis virus produced by culturing cells from a cell line, and in that the cellular DNA content is less than 100 pg/dose, is also disclosed.</p>			
(57) Abrégé			
<p>L'invention concerne un procédé de production industrielle d'un vaccin contre l'encéphalite japonaise, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes: a) mise en culture de cellules provenant d'une lignée cellulaire, b) inoculation de la culture de cellules obtenue par du virus de l'encéphalite japonaise en présence d'un milieu de multiplication virale, c) propagation et multiplication du virus sur les cellules, d) récolte du milieu de multiplication virale constituant une suspension de virus produits par les cellules, e) purification de la suspension virale par au moins une étape de chromatographie échangeuse d'ions et une étape de perméation de gel, f) formulation et mise sous forme pharmaceutique de la suspension virale pour assurer sa conservation jusqu'à son utilisation. L'invention concerne également un vaccin contre l'encéphalite japonaise caractérisé en ce qu'il comporte du virus de l'encéphalite japonaise obtenu par culture sur cellules provenant d'une lignée cellulaire, et en ce que la teneur en ADN cellulaire est inférieure à 100 pg/dose.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Procédé de production industrielle d'un vaccin
contre l'encéphalite japonaise et vaccin obtenu

La présente invention a trait à un procédé de production d'un vaccin pour la prévention de l'encéphalite japonaise, à base de virus de l'encéphalite japonaise (JEV) et notamment d'un vaccin utilisable chez l'homme. L'invention a également trait au vaccin obtenu par ce procédé.

Le virus de l'encéphalite japonaise, dont le vecteur de transmission est un moustique, est la cause d'infections graves, dites encéphalites japonaises, dans de nombreux pays d'Extrême-Orient ainsi que dans d'autres régions du monde.

On connaît des vaccins contre l'encéphalite japonaise qui sont obtenus par des procédés consistant à injecter le virus JEV par voie intracrânienne chez le souriceau et à récupérer les tissus infectés. L'émulsion tissulaire que l'on obtient est ensuite purifiée, généralement par des méthodes de précipitation, notamment à la protamine. D'autres techniques de purification de ces préparations tissulaires ont également été proposées dans la littérature, telles que des techniques d'ultrafiltration, de filtration et de centrifugation, ou de précipitation au polyéthylène glycol, ces techniques pouvant être combinées entre elles ou à des techniques de gel-filtration, de chromatographie sur sulfate de cellulose ou sur sulfate de polysaccharide réticulé (JP-B-65 000 611, JP-A-53 133 627, JP-A-50 048 118, JP-A-2 223 531, US-A-4 725 546, JP-A-49 020 322 et B-81 005 204, JP-B-67 025 408).

Dans l'art antérieur, les préparations virales sont inactivées, ainsi que le recommande l'Organisation Mondiale de la Santé, par des agents chimiques tels que le formol selon des procédures standardisées, à savoir inactivation de longue durée

pendant cinquante à soixante jours à +4°C à une concentration de formol de 1/2000, en raison de l'instabilité des virus à des températures plus élevées dans cet environnement.

5 Les vaccins du commerce ainsi obtenus sont efficaces mais sont difficiles et coûteux à préparer, purifier et inactiver. Ils peuvent, en outre, conduire à des réactions secondaires dues aux contaminants provenant des tissus de souris, ce qui en limite, parfois, l'application.

10 Il est donc souhaitable de pouvoir produire un vaccin par d'autres techniques de nature plus industrielle et notamment en utilisant une multiplication et une propagation du virus sur lignée cellulaire. Toutefois, la production d'un vaccin en grandes quantités, par des méthodes très industrialisées, est beaucoup plus difficile que dans le cas de la multiplication par voie intracrânienne, et ceci non seulement en raison des quantités importantes qui doivent être traitées, mais également des difficultés d'obtenir et de contrôler des rendements élevés, ainsi que des problèmes de purification posés par les contaminants pouvant provenir des cellules ou du milieu de multiplication virale que sont alors rencontrés.

25 Il est connu dans l'art antérieur que le virus de l'encéphalite japonaise peut se propager sur diverses cultures de cellules, y compris sur des cultures de lignées cellulaires, notamment des cellules Vero. Cependant, les méthodes de culture divulguées ne permettent pas d'obtenir des rendements satisfaisants dans des conditions de culture industrielle à grande échelle, qui seule permet une production à un coût raisonnable. Il n'est pas non plus décrit, dans l'art antérieur, de méthode pour purifier à un haut degré les préparations virales provenant de la propagation et de la multiplica-

tion sur lignées cellulaires.

L'invention se propose donc de remédier à ces inconvénients et de fournir un procédé de production d'un vaccin contre l'encéphalite japonaise, qui puisse être mis en oeuvre à grande échelle dans des conditions sûres, rapides et économiques et qui permette d'obtenir un vaccin, efficace d'une très grande pureté, avec un très bon rendement industriel.

Pour atteindre ces buts, l'invention a pour objet un procédé de production industrielle d'un vaccin contre l'encéphalite japonaise, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- a) mise en culture de cellules provenant d'une lignée cellulaire,
- b) inoculation de la culture de cellules obtenues par du virus de l'encéphalite japonaise en présence d'un milieu de multiplication virale,
- c) propagation et multiplication du virus sur les cellules,
- d) récolte du milieu de multiplication virale constituant une suspension de virus produits par les cellules,
- e) purification de la suspension virale par au moins une étape de chromatographie échangeuse d'ions et une étape de perméation de gel,
- f) formulation et mise sous forme pharmaceutique de la suspension virale pour assurer sa conservation jusqu'à son utilisation.

Selon une caractéristique particulière de l'invention, la quantité de virus inoculée correspond à une multiplicité d'infection inférieure à 0,1. Ainsi, on obtient un bon rendement pour la propagation et la multiplication virale.

Selon une caractéristique particulière de l'invention, le procédé comprend, en outre, une étape d'inactivation de la suspension virale avant ou après

l'étape de purification e). Il est ainsi possible de fabriquer un vaccin inactivé tout en utilisant pour la propagation et la multiplication virale une souche virulente.

5 Selon une caractéristique du procédé de l'invention, l'inactivation est réalisée au moyen d'un agent chimique à température ambiante. Ainsi, l'inactivation se produit rapidement.

10 Selon un mode particulier de réalisation, le procédé consiste à utiliser une lignée de cellules Vero pour assurer la multiplication virale. Il est ainsi possible d'obtenir de bons rendements car ces cellules sont très permissives au virus de l'encéphalite japonaise.

15 Selon une autre caractéristique de réalisation de l'invention, le procédé consiste à purifier la suspension virale en effectuant les étapes suivantes :

- 20 . chromatographie par échange d'ions,
- . chromatographie d'adsorption,
- . perméation de gel.

Il est, ainsi, possible d'obtenir un vaccin à très haut degré de pureté.

25 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le procédé consiste, en outre, après l'étape de récolte d), à introduire à nouveau du milieu de multiplication virale neuf, à attendre un temps suffisant pour permettre à nouveau la multiplication du virus et à effectuer une nouvelle récolte du milieu de multiplication virale.

30 On peut, ainsi, obtenir un nombre important de récoltes à partir d'une même culture cellulaire.

35 L'invention a également pour objet un vaccin obtenu par culture sur cellules provenant d'une lignée cellulaire caractérisé en ce qu'il comporte du virus de l'encéphalite japonaise et en ce que la teneur en ADN

cellulaire est inférieure à 100 pg/dose.

Un tel vaccin présente à la fois l'efficacité et la sûreté nécessaire tant du point de vue des contaminants viraux que des protéines pour être administré de façon systématique à toute personne susceptible d'être en contact avec le virus.

D'autres objets et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre.

Selon l'invention, on peut effectuer la culture cellulaire, soit en fermenteur, soit de façon traditionnelle en flacons (boîtes de Roux, flacons roulants, Multiray™, Cell-Cube™...).

De préférence, cependant, on dispose d'un fermenteur de grand volume (500 à 2000 l) contenant des microporteurs ainsi qu'un milieu de culture cellulaire, dans lequel on introduit un inoculum de cellules d'une lignée cellulaire permissive au virus de l'encéphalite japonaise ; il peut s'agir de cellules BHK 21 (Baby Hamster Kidney) ou encore de cellules Vero.

Les microsupports permettant la culture en suspension dans le fermenteur peuvent être différents microsupports déjà connus pour un tel usage ; on peut notamment citer les particules Cytodex 1™ à une concentration de 1 à 3 g/l de milieu de culture comme convenant particulièrement bien à la culture de cellules Vero. Les durées, températures et autres conditions de culture, et notamment la composition du milieu de culture sont adaptées en fonction de la nature des cellules Vero sur microsupports de Cytodex 1™, une durée de 4 jours était appropriée pour obtenir une bonne croissance cellulaire et permettre ainsi d'inoculer le virus avant la phase stationnaire de la culture. On remplace ensuite le milieu de culture par un milieu de multiplication virale et on introduit dans le fermenteur un inoculum de virus de

l'encéphalite japonaise avec une quantité calculée pour avoir une faible valeur de la multiplicité d'infection (ou MOI pour Multiplicity of Infection) qui est le rapport de la quantité de particules virales introduites sur le nombre de cellules présentes.

Cette multiplicité est de préférence inférieure à environ 0,1 et de préférence encore inférieure à 0,01.

La souche virale utilisée peut être une souche atténuée telle que la souche SA 14-14-2 ou toute souche immunogène virulente connue telle que la souche Nakayama ou Beijing. La souche P₃ au 88ème passage fournie par le NVSI (National Vaccine and Serum Institute, Beijing) convient bien aux besoins de l'invention.

Le milieu utilisé pour la multiplication virale est un milieu habituel, tel que le MEM, dans lequel il est important que la quantité de protéines soit réduite le plus possible. On utilise de préférence un milieu dont la concentration en protéines, qui est habituellement de l'albumine humaine, est inférieure à 5 g/l. De préférence même, on utilise un milieu de culture complètement dépourvu en protéines.

La durée nécessaire à la propagation et à la multiplication virale peut être déterminée par la surveillance du titre infectieux. On considère qu'une récolte de virus peut être effectuée lorsque le titre LD 50/ml est de l'ordre de 10^7 ou 10^8 . La récolte est effectuée par simple prélèvement du milieu de multiplication virale qui contient les virus produits par les cellules. De façon avantageuse, après avoir prélevé le milieu de multiplication virale, on introduit à nouveau dans le fermenteur du milieu neuf afin de permettre une nouvelle multiplication du virus conduisant à une nouvelle récolte. On peut, ainsi, obtenir facilement

jusqu'à 8 récoltes successives dans le même fermenteur à partir de la même culture cellulaire. La durée nécessaire à la propagation et à la multiplication du virus pour obtenir une dose LD 50/ml de 10^7 ou 10^8 est généralement de 2 à 3 jours ; on réalise de préférence une première récolte 3 jours après l'inoculation virale, puis des récoltes successives tous les 2 ou 3 jours.

Ainsi, un cycle complet dans un fermenteur, peut durer 23 jours répartis de la façon suivante :

. J0 : démarrage de la culture de cellules sur les microsupports dans le fermenteur,

. J4 : remplacement du milieu de culture cellulaire par du milieu de multiplication virale et inoculation du virus,

. J7 : première récolte,

. J9 : deuxième récolte,

. J11 : troisième récolte,

. J14 : quatrième récolte,

. J16 : cinquième récolte,

. J18 : sixième récolte,

. J21 : septième récolte,

. J23 : huitième récolte.

Les différentes récoltes obtenues peuvent ensuite être traitée séparément ou en mélange.

Le traitement consiste soit en une purification et une inactivation, l'inactivation pouvant être réalisée avant ou après l'étape de purification.

L'inactivation est une étape indispensable au procédé selon l'invention lorsque la souche virale utilisée au départ est une souche virulente ; par contre, lorsque la souche utilisée pour la multiplication virale est une souche atténuée telle que la souche SA 14-14-2, cette étape d'inactivation peut être soit omise, soit réalisée afin d'être dans les meilleures conditions de sécurité possibles.

Selon l'invention, on effectue l'inactivation au moyen d'agents chimiques à une température ambiante. Par température ambiante selon l'invention, on entend une température largement supérieure à + 4°C qui est la température habituellement utilisée par l'inactivation du virus JEV. Cette température peut avantageusement être comprise entre 20 et 37°C et on préfère une température de l'ordre de 25°C. On a, en effet, constaté que le virus est rapidement inactivé à cette température et on a, en outre, pu noter que, de façon surprenante, le virus contenu dans son milieu de multiplication virale, est stable malgré la température élevée ; cette durée très courte de l'inactivation est un avantage important du procédé de l'invention d'un point de vue industriel.

Les agents chimiques utilisés pour l'inactivation peuvent notamment être le formol ou la bétapropiolactone ; on préfère le formol. On peut, par exemple, effectuer l'inactivation à l'aide de formol à 25 ou à 37°C pendant 14 jours ou moins ; de préférence, la durée sera d'au moins 7 jours. De façon avantageuse selon l'invention, la concentration de formol utilisé peut être inférieure à celle classiquement utilisée dans l'inactivation du virus JEV ; elle peut, par exemple, être de l'ordre de 1/2000 à 1/8000 et notamment de 1/4000.

Il est possible également de procéder successivement à 2 étapes d'inactivation différentes mettant par exemple en oeuvre 2 agents chimiques différents.

On peut également, avant cette étape d'inactivation, procéder à la filtration de chaque récolte afin d'éliminer les débris cellulaires (protéines, acides nucléiques...), ainsi qu'à sa concentration de façon à augmenter le titre en virus et la teneur en protéines du milieu liquide. Le facteur de concentration est de préférence au moins égal à 10, par exemple de l'ordre de

1000. La concentration peut être effectuée par les moyens habituels et notamment l'ultrafiltration.

La suspension virale, inactivée ou non selon le procédé utilisé, doit être purifiée. Selon une caractéristique importante de l'invention, l'étape de purification comprend au moins une chromatographie. De façon avantageuse, on procède successivement aux 3 étapes suivantes :

- . chromatographie échangeuse d'ions,
- . chromatographie d'adsorption,
- . perméation de gel.

La chromatographie échangeuse d'ions est de préférence une chromatographie échangeuse d'anions, qu'ils soient faibles ou forts. Le support utilisé est par exemple le DEAE-Sphero-dex™ (vendu par Biosepra, USA) qui retient sélectivement les particules virales et laisse passer l'essentiel des protéines contaminantes.

L'éluat contenant les virus peut ensuite être effectuée sur des supports tels que l'hydroxyapatite ou les gels chélatants (calcium...). Dans ce cas, le virus ne se fixe pas sur le support qui retient plus spécialement les acides nucléiques.

A la suite de cette étape, on procède à une gel filtration ou tamisage moléculaire (encore appelé perméation de gel) sur tout support approprié tel que le Sepharose 6FF™ (Pharmacia) ou le Fractogel™ (E. Merck). Lors de cette opération, l'élution permet de récupérer les particules virales dans la première fraction ; les pics d'élution suivants correspondent aux protéines virales et aux impuretés résiduelles. On conserve donc uniquement, pour la fabrication d'un vaccin, la première fraction de l'éluat.

De façon avantageuse, on peut procéder, entre la chromatographie d'adsorption et la gel filtration, à une étape de concentration, de préférence par ultra-

filtration avec une membrane dont le seuil de coupure est de 10 000 daltons.

La suspension virale purifiée et éventuellement inactivée est ensuite formulée pour obtenir le titre antigénique désiré ; on peut également lui ajouter un stabilisant ou un adjuvant ; elle est ensuite mise sous forme pharmaceutique afin d'être conservée dans de bonnes conditions jusqu'à son utilisation.

Exemple.

1. Matériels

- cellules Vero : les cellules Vero utilisées pour inoculer le fermenteur proviennent d'une banque cellulaire Vero au 137ème passage, banque ayant subi tous les contrôles nécessaires à sa caractérisation et à sa qualification.

- Le virus JEV : la souche virale utilisée est la souche P₃ au 88ème passage fournie par le NVSI.

Une ampoule de virus reçue est mise en suspension dans 100 ml de milieu et filtrée à l'aide d'un filtre 0,1 µm. La solution est utilisée pour infecter deux flacons de 75 cm². Cinq jours après, le surnageant recueilli est filtré (filtre de 0,2 µm). Plusieurs récoltes ont été faites et le mélange formant le lot de semence primaire présente un titre LD 50/ml = 10^{8,16}. On prépare le lot de semence de travail à raison de 10 ml de lot de semence primaire pour infecter 12 flacons roulants de 850 cm². Plusieurs récoltes peuvent être effectuées et le mélange de 30,2 litres a un titre LD 50/ml = 10^{8,31}.

Les lots de semence primaire et de travail sont ensuite contrôlés afin d'assurer leur caractérisation et leur qualification.

2. Procédé du culture

On remplit la cuve d'un fermenteur de 500 l, avec un milieu de culture usuel pour cellules Vero

contenant des microsupports Cytodex 1™ à une concentration de 3 g/l. On ensemence le milieu par un inoculum de cellules Vero (200 000 cellules/ml).

5 On laisse les cellules se fixer et croître pendant quatre jours. A la fin des quatre jours, le milieu de culture est remplacé par un milieu de multiplication virale.

10 Un inoculum de virus est introduit dans la cuve avec une quantité de virus calculée pour avoir une multiplicité d'infection MOI égale à 1/500. Les différentes cultures sont effectuées à la température de 37°C. Trois jours après l'inoculation virale, on recueille le milieu de multiplication virale qui fournit la première récolte. Le milieu de multiplication virale est remplacé
15 par un milieu neuf et une nouvelle récolte est effectuée tous les deux jours, le nombre total de récoltes étant égal à six.

Le tableau I montre les titres obtenus à chaque récolte.

20

Récoltes n°	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Jours après infection	3	5	7	10	12	14
25 Titre LD 50/ml	10 ^{8,4}	10 ^{8,4}	10 ^{8,5}	10 ^{8,1}	10 ^{8,2}	10 ^{7,3}

Les récoltes sont filtrées sur filtre membrane (diamètre des pores : 0,2 µm).

30

L'ensemble des récoltes est mélangé.

Le mélange de récolte est concentré d'un facteur 100 par ultrafiltration sur membrane 10 000 daltons.

On ajoute au mélange de récolte concentré une solution de formol à une concentration finale de 1/4000 et on maintient à température ambiante (de 20 à 25°C) sous agitation continue pendant 14 jours.

5 On procède ensuite à une nouvelle filtration et on vérifie l'inactivation par un contrôle en 2 étapes selon le protocole de l'OMS (Rapport technique 771 de 1988).

10 Toutes les préparations inactivées par le formol se sont montrées satisfaisantes.

La solution inactivée est passée sur une colonne chromatographique d'échange d'ions à groupement DEAE équilibrée à pH 8, (résine DEAE-Sphérodex™). Le virus est retenu sur la colonne. Après lavage par un tampon phosphate, le virus est élué par un tampon phosphate, NaCl 0,2M. La majorité des contaminants protéiques sont ainsi éliminés.

15 L'éluat est purifié par affinité de chélation par interaction calcique en injectant l'éluat à travers une colonne de Chelating Sepharose™ (Pharmacia). Le virus n'est pas fixé et traverse directement la colonne.

20 On procède ensuite à une concentration par ultrafiltration sur des membranes dont le seuil de coupure est de 10 000 Da pour réduire le volume de la suspension virale d'un facteur d'environ 20.

25 La solution concentrée de virus prépurifiée est introduite dans une colonne de Sepharose 6 FF™. On procède à une élution par un tampon phosphate NaCl 0,2M. Les particules virales se trouvent éluées dans la fraction exclue.

30 Les caractéristiques du procédé de purification figurent sur le tableau II.

Tableau II

Etape	DEAE	Chélation	Gel filtration
Protéines résiduelles (*)	50 %	100 %	0,4 %
Teneur en ADN (pg/ml)	< 7000	< 30	< 30
Virus récupéré (*) (ELISA protéine E)	90 %	76 %	20 %

(*) Rendements étapes par étape

La solution virale inactivée purifiée a été utilisée pour immuniser des souris par injection au jour 0 puis au jour 7. L'épreuve par le virus virulent est effectuée à l'aide d'une solution à 10^5 LD 50/ml au jour 30. Toutes les souris vaccinées par la préparation purifiée non diluée et par la préparation purifiée diluée au 1/32 ont été protégées. Dans le même test, les souris vaccinées par le vaccin Biken (dilution 1/32) ont été éprouvées et seules les 2/5 ont été protégées.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production industrielle d'un vaccin contre l'encéphalite japonaise, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) mise en culture de cellules provenant d'une lignée cellulaire,
 - b) inoculation de la culture de cellules obtenue par du virus de l'encéphalite japonaise en présence d'un milieu de multiplication virale,
 - c) propagation et multiplication du virus sur les cellules,
 - d) récolte du milieu de multiplication virale constituant une suspension de virus produits par les cellules,
 - e) purification de la suspension virale par au moins une étape de chromatographie échangeuse d'ions et une étape de perméation de gel,
 - f) formulation et mise sous forme pharmaceutique de la suspension virale pour assurer sa conservation jusqu'à son utilisation.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la quantité de virus inoculée correspond à une multiplicité d'infection (MOI) inférieure à 0,1.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, une étape d'inactivation de la suspension virale avant ou après l'étape de purification e).

4. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que l'inactivation est réalisée au moyen d'agent chimique à température ambiante.

5. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules utilisées pour la multiplication virale sont des cellules VERO.

6. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la purification est

effectuée grâce aux opérations suivantes :

- . chromatographie par échange d'ions,
- . chromatographie d'adsorption,
- . perméation de gel.

5 7. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste en outre, après l'étape de récolte d), à introduire à nouveau du milieu de multiplication virale neuf, à attendre un temps
10 suffisant pour permettre à nouveau la multiplication du virus, et à effectuer une nouvelle récolte du milieu de multiplication virale.

 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il consiste à récolter le milieu de multiplication virale et à le remplacer par du milieu
15 neuf, un nombre de fois compris entre 1 et 7.

 9. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste en outre, après l'étape d) à filtrer la suspension virale récoltée.

20 10. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le milieu de multiplication virale possède une concentration en protéines inférieure à 5 g/l.

25 11. Vaccin contre l'encéphalite japonaise, caractérisé en ce qu'il comporte du virus de l'encéphalite japonaise obtenu par culture sur cellules provenant d'une lignée cellulaire, et en ce que la teneur en ADN cellulaire est inférieur à 100 pg/dose.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K39/12 C12N7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 64, 1 July 1977 Philadelphia, PA, US; abstract no. 2449, C.N. VENKATESHAN ET AL.: "COMPARATIVE STUDIES ON DIFFERENT METHODS FOR CONCENTRATION OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRAL ANTIGENS PREPARED FROM VERO CELL CULTURE." page 245; XP002000470 see abstract & INDIAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH, vol. 64, no. 11, 1976, pages 1557-1565,</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 1996

Date of mailing of the international search report

05. 11. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patendaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/01195

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 171 765 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) 19 February 1986 cited in the application see the whole document ---	1-11
A	WO,A,91 09935 (IMMUNO A.G.) 11 July 1991 see page 1, paragraph 1 - paragraph 4; claims -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01195

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-171765	19-02-86	JP-C- 1427486	25-02-88
		JP-A- 61047185	07-03-86
		JP-B- 62033879	23-07-87
		CA-A- 1251400	21-03-89
		US-A- 4725546	16-02-88

WO-A-9109935	11-07-91	AT-B- 393356	10-10-91
		AT-T- 113652	15-11-94
		CA-A,C 2071954	23-06-91
		DE-D- 59007659	08-12-94
		EP-A- 0506714	07-10-92
		ES-T- 2067916	01-04-95
		HR-A- 921354	29-02-96
		HU-A- 65410	28-06-94
		JP-T- 5502581	13-05-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No
PCT/FR 96/01195

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 A61K39/12 C12N7/02		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 A61K C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 64, 1 Juillet 1977 Philadelphia, PA, US; abstract no. 2449, C.N. VENKATESHAN ET AL.: "COMPARATIVE STUDIES ON DIFFERENT METHODS FOR CONCENTRATION OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRAL ANTIGENS PREPARED FROM VERO CELL CULTURE." page 245; XP002000470 voir abrégé & INDIAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH, vol. 64, no. 11, 1976, pages 1557-1565, <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center;">29 Octobre 1996</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center;">05. 11. 96</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">Ryckebosch, A</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. -te Internationale No
PCT/FR 96/01195

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP,A,0 171 765 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) 19 Février 1986 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-11
A	WO,A,91 09935 (IMMUNO A.G.) 11 Juillet 1991 voir page 1, alinéa 1 - alinéa 4; revendications -----	1-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 96/01195

FCI/FR 90/01155

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-171765	19-02-86	JP-C- 1427486	25-02-88
		JP-A- 61047185	07-03-86
		JP-B- 62033879	23-07-87
		CA-A- 1251400	21-03-89
		US-A- 4725546	16-02-88

WO-A-9109935	11-07-91	AT-B- 393356	10-10-91
		AT-T- 113652	15-11-94
		CA-A,C 2071954	23-06-91
		DE-D- 59007659	08-12-94
		EP-A- 0506714	07-10-92
		ES-T- 2067916	01-04-95
		HR-A- 921354	29-02-96
		HU-A- 65410	28-06-94
JP-T- 5502581	13-05-93		
